



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 24 日 (24.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/06307 A1

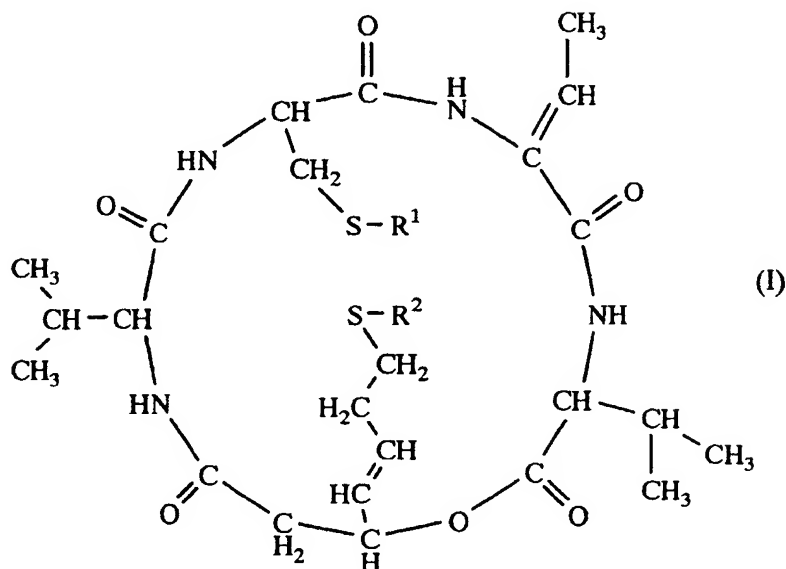
- | | |
|--|--|
| <p>(51) 国際特許分類⁷: C07K 5/103, C12N 9/99, A61K 38/12, A61P 29/00, 35/00, 3/10, 7/06, 1/16, 35/02, 37/06, 43/00, 48/00</p> | <p>(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島秀典 (NAKA-JIMA, Hidenori) [JP/JP]; 〒305-0863 茨城県つくば市緑ヶ丘 29-2 Ibaraki (JP). 田中明人 (TANAKA, Akito) [JP/JP]; 〒305-0051 茨城県つくば市二ノ宮 2-25-6-502 Ibaraki (JP). 吉田 稔 (YOSHIDA, Minoru) [JP/JP]; 〒334-0059 埼玉県川口市安行 655-21 Saitama (JP). 堀之内末治 (HORINOCHI, Sueharu) [JP/JP]; 〒135-0044 東京都江東区越中島 1-3-16-403 Tokyo (JP).</p> |
| <p>(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05954</p> | |
| <p>(22) 国際出願日: 2001 年 7 月 9 日 (09.07.2001)</p> | |
| <p>(25) 国際出願の言語: 日本語</p> | |
| <p>(26) 国際公開の言語: 日本語</p> | |
| <p>(30) 優先権データ:
特願2000-216584 2000 年 7 月 17 日 (17.07.2000) JP</p> | <p>(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0044 大阪府大阪市中央区伏見町 4 丁目 2 番 14 号 藤村大和生命ビル Osaka (JP).</p> |
| <p>(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 Osaka (JP).</p> | <p>(81) 指定国 (国内): JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, NL, PT, SE).</p> |

[続葉有]

(54) Title: REDUCED FK228 AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 還元型FK228およびその用途



(57) Abstract: Reduced FK228 represented by general formula (I) or salts thereof; histone deacetylase inhibitors, transferred gene expression potentiators and reactivation promoters comprising these compounds; and drugs containing the same as the active ingredient, wherein R¹ and R² are the same or different and each represents hydrogen or a thiol-protective group. Because of having a potent histone deacetylase inhibitory activity, these reduced FK228 and salts thereof are usable in preventing and treating various diseases in which deacetylation of histone participates and gene therapy for these diseases.

[続葉有]

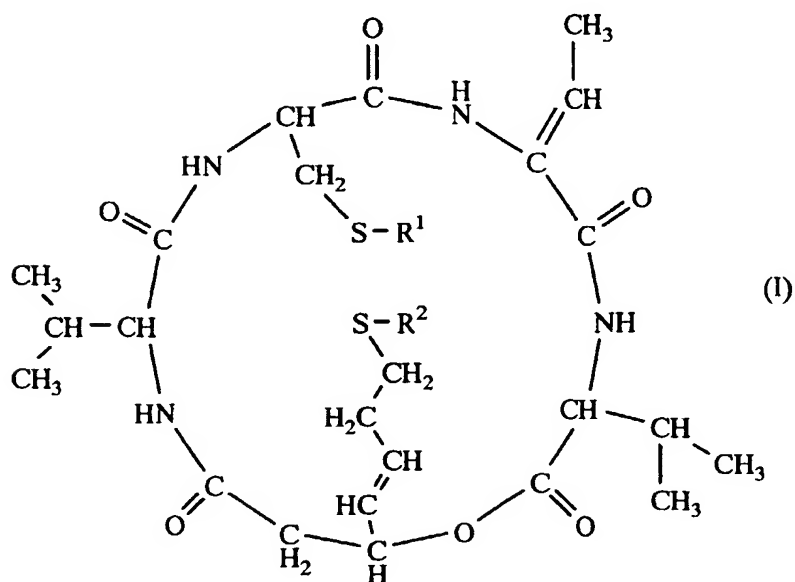


添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は一般式 (I)



(式中R¹およびR²はそれぞれ同一または異なって水素原子またはチオール保護基である) で表される還元型FK228またはその塩、および当該化合物からなるヒストンデアセチラーゼ阻害剤、導入遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤、ならびにそれらを有効成分とする医薬に関する。還元型FK228またはその塩は、強力なヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有し、当該化合物は、ヒストン脱アセチル化が関与する各種疾患の予防・治療ならびに当該疾患の遺伝子治療に使用し得る。

明細書

還元型 F K 2 2 8 およびその用途

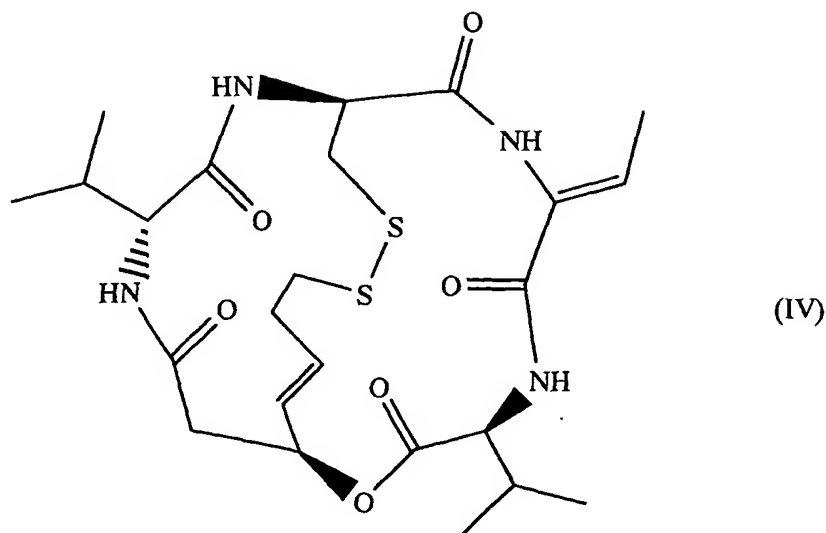
技術分野

本発明は、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物ならびにその用途
5 に関する。

背景技術

ヒストンデアセチラーゼは、活性中心に Zn を配位したメタロ脱アセチル化酵素である (M.S. Finnin ら, Nature 401, 188-193 (1999))。本酵素は、各種アセチル化ヒストンの DNA に対する親和性を変化させると考えられている。これ
10 によってもたらされる直接的な生物現象は、クロマチン構造変化である。クロマチン構造の最小単位は、ヒストン 8 量体 (H 2 A、H 2 B、H 3 及び H 4、各 2 分子、コアヒストン) に、1 4 6 b p の DNA が 1.8 回左巻きに巻き付いたヌクレオソームである。コアヒストンは、各ヒストンタンパク質の N 末の正電価が DNA と相互作用することにより、ヌクレオソーム構造を安定化している。ヒス
15 トンのアセチル化は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼの関与するアセチル化反応とヒストンデアセチラーゼの関与する脱アセチル化反応の平衡関係により調節されている。ヒストンのアセチル化は、ヒストンタンパク質 N 末の進化的に良く保存されたリジン残基において起こり、これにより、コアヒストンタンパク質は、N 末の電価を失い、DNA との相互作用が減弱され、ヌクレオソームの構
20 造が不安定になると考えられている。従って、ヒストンの脱アセチル化は、この逆、すなわちヌクレオソーム構造の安定化に向かうと考えられている。しかしながら、アセチル化が、どの程度クロマチン構造を変化させるのか、また、それによって 2 次的に誘導される転写調節等とどの様に関係しているのかについては、不明な点が多い。

25 一方、式 (IV)



で表される化合物（以下FR 9 0 1 2 2 8物質ともいう）は、ヒストンデアセチラーゼを選択的に阻害することにより、強力な抗腫瘍活性を誘導することが報告されている。さらに当該物質は、処理した細胞にヒストンの高アセチル化を引き起こし、結果として、各種遺伝子の転写調節活性、細胞周期阻害活性及びアポトーシス阻害活性を誘導する（特公平7-64872号公報、H. Nakajima ら, *Exp. Cell Res.* 241, 126-166 (1998)）。現在までに各種の天然物由来のヒストンデアセチラーゼ阻害剤が報告されているが、FR 9 0 1 2 2 8物質は、ヒストンのアセチル化と発現する生物現象とを結びつけ、且つ臨床でもその有用性が支持される最初の薬剤である。FR 9 0 1 2 2 8物質は、分子内にジスルフィド結合を有する。

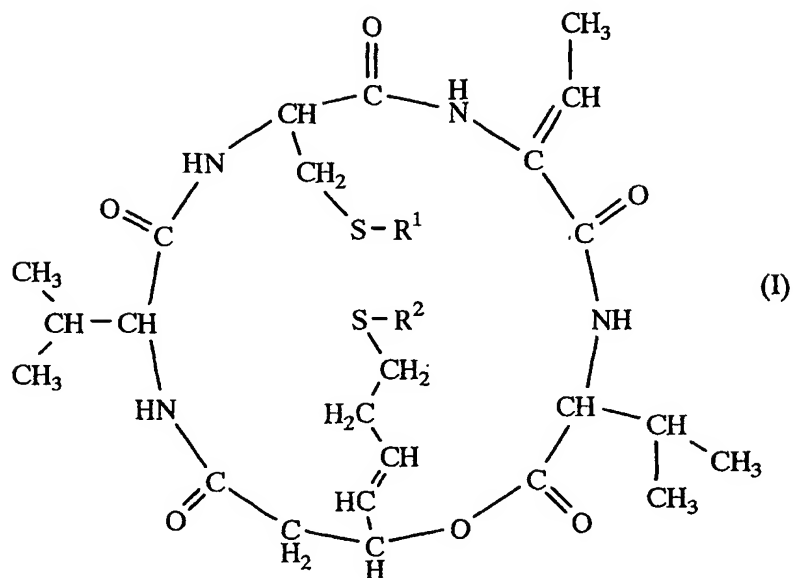
本発明の目的は、より強力なヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物ならびに当該化合物からなるヒストンデアセチラーゼ阻害剤を提供することにある。さらに本発明の別の目的は、当該ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物の医薬としての用途を提供することにある。

発明の開示

本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、FR 9 0 1 2 2 8物質のジスルフィド結合を還元しチオール体とすることによって、より強いヒストンデアセチラーゼ阻害活性が得られることを見出し、さらに当該化合物の医薬

としての有用性を見出して本発明を完成するに至った。即ち本発明は下記の通りである。

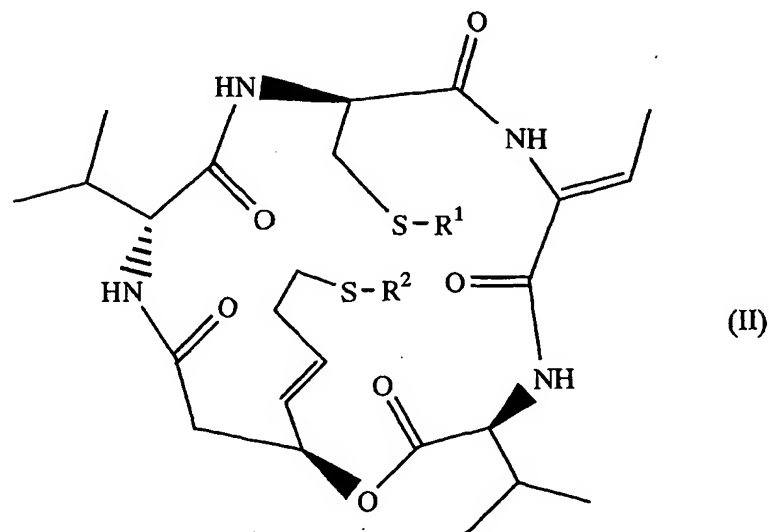
(1) 式 (I)



5 (式中 R^1 および R^2 はそれぞれ同一または異なって水素原子またはチオール保護基である) で表される化合物またはその塩。

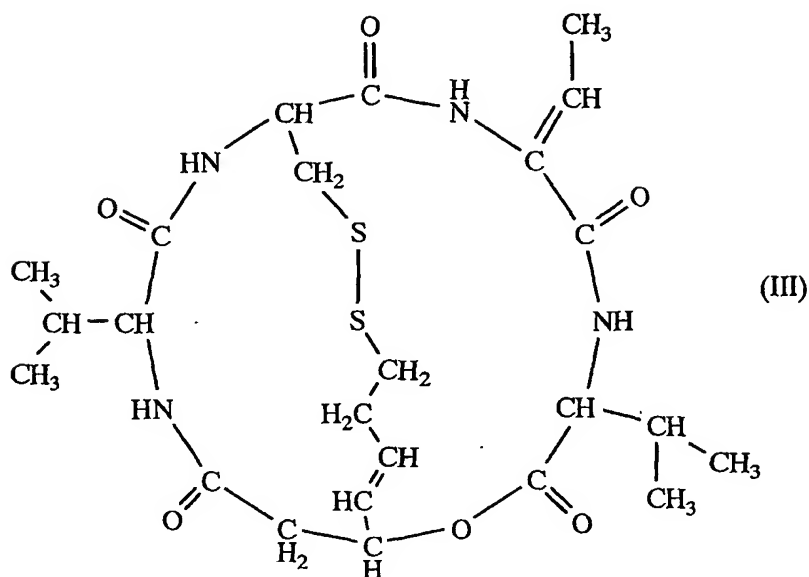
(2) R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子である上記 (1) 記載の化合物またはその塩。

(3) 式 (II)



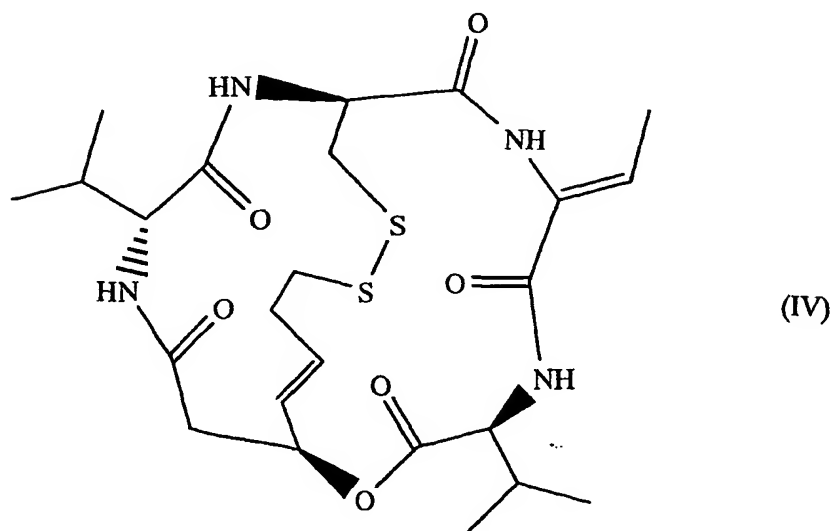
(式中 R^1 および R^2 はそれぞれ水素原子である)で表される化合物(以下FR 1 3 5 3 1 3物質ともいう)である、上記(2)記載の化合物またはその塩。

(4) 式 (III)



5 で表される化合物(以下FK 2 2 8ともいう)におけるジスルフィド結合を開裂する工程を含む、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩の製造方法。

(5) 式 (III) 化合物が、式 (IV)



10 で表される化合物(以下FR 9 0 1 2 2 8物質ともいう)である、上記(4)記

載の製造方法。

(6) 式(IV)化合物を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株を水性栄養培地中で好気性条件下に培養し、当該化合物を回収する工程および該回収した式(IV)化合物におけるジスルフィド結合を開裂する工程を含む、上記(5)記

5 載の製造方法。

(7) 上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩からなるヒストンデアセチラーゼ阻害剤。

(8) 有効成分として、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、
10 線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病(APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の治療または予防用の医薬組成物。

(9) 有効成分として、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

(10) 医薬である上記(9)記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。
15

(11) 医薬が遺伝子治療用である上記(10)記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

(12) 医薬的に有効量の、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩を患者に投与することを含む、腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病(APL)、臓器
20 移植拒絶または自己免疫疾患の治療方法または予防方法。

(13) 医薬的に有効量の、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩を患者に投与することを含む、導入遺伝子の発現増強方法または再活性化促進方法。

(14) 患者への投与が遺伝子治療において実施されるものである、上記(13)に記載の方法。
25

(15) 腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維

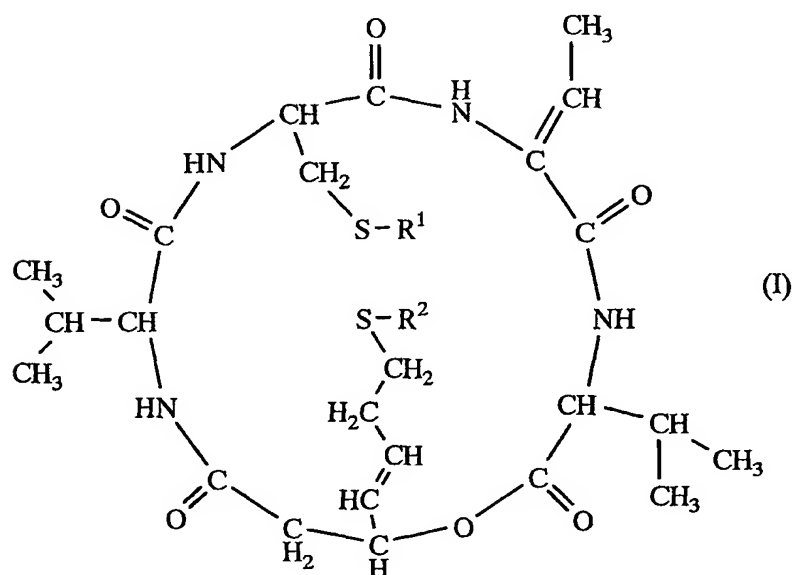
症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病(APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の治療または予防用医薬組成物の製造のための、上記(1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩の使用。

(16) 導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤の製造のための、上記
5 (1)～(3)のいずれかに記載の化合物またはその塩の使用。

(17) 導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤が遺伝子治療に使用されるものである、上記(16)に記載の使用。

発明の詳細な説明

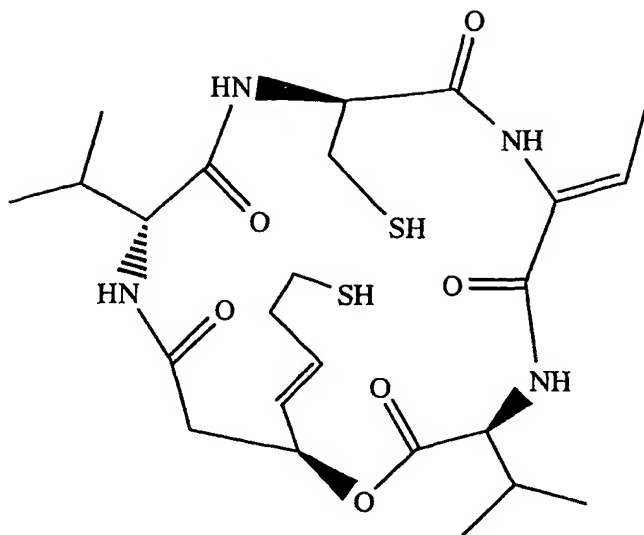
本発明は、下記式(I)



10

(式中 R^1 および R^2 はそれぞれ同一または異なって水素原子またはチオール保護基である)

で表される化合物またはその塩を提供する。好ましくは R^1 および R^2 はともに水素原子であり、より好ましくは下記式



で表される F R 1 3 5 3 1 3 物質である。

上記定義およびそれらの好ましい実施態様の詳細を、以下に詳細に説明する。

本明細書中で用いられる用語「低級」は、他に示されない限り、1～6の炭素
5 原子を意味する。

本発明において、適切なチオール保護基は通常当分野で用いられるものであり、
以下のものが挙げられる：任意に置換基を有するベンジル基〔置換基としては低
級アルコキシ（例えばメトキシ等）、アシルオキシ（例えばアセトキシ等）、ヒ
ドロキシ、ニトロ等が挙げられる〕、ピコリル、ピコリル-N-オキシド、アン
10 トリルメチル、ジフェニルメチル、フェニル、ト-ブチル、アダマンチル、アシ
ルオキシメチル（例えばピバロイルオキシメチル、第3級ブトキシカルボニルオ
キシメチル等）等のチオエーテルを形成してチオール基を保護するもの；
低級アルコキシメチル（例えばメトキシメチル、イソブトキシメチル等）、テト
ラヒドロピラニル、ベンジルチオメチル、フェニルチオメチル、チアゾリジン、
15 アセトアミドメチル、ベンズアミドメチル等のモノチオ、ジチオあるいはアミノ
チオアセタールを形成してチオール基を保護するもの；
第3級ブトキシカルボニル（BOC）、アセチルおよびその誘導体、ベンゾイル
およびその誘導体等のチオエステルを形成してチオール基を保護するもの；
カルバモイル、フェニルカルバモイル、低級アルキルカルバモイル（例えばメチ

ルカルバモイル、エチルカルバモイル等)等のカルバミン酸チオエステルを形成してチオール基を保護するもの;

等が例示されるが本発明はこれらに何ら限定されるものではない。より具体的には PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Second Edition, T.W. Greene,

5 P.G.M. Wuts WILEY-INTERSCIENCE に記載されている各保護基が好適に用いられる。

上記式 (I) の化合物は、不斉炭素原子および二重結合に基づく光学異性体または幾何異性体等の立体異性体を有することがあるが、これらすべての異性体及びそれらの混合物もこの発明の範囲に含まれる。さらに、式 (I) 化合物は塩を形成することができ、これもまた本発明に包含される。当該塩は生物学的に許容
10 される通常無毒の塩であり、無機塩基との塩 (例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩)、有機塩基との塩 (例えばトリエチルアミン塩、ジイソプロピルエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N', N'-ジベンジルエチレンジア
15 ミン塩等の有機アミン塩)、無機酸付加塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)、有機カルボン酸もしくはスルホン酸付加塩 (例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、塩基性あるいは酸性アミノ酸 (例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等) との塩
20 等の、塩基との塩または酸付加塩が例示される。加えて、それらの溶媒和化合物 (例えば包接化合物 (例えば水和物等)) もまた、本発明に包含される。

本発明の式 (I) 化合物は、式 (III) で表される化合物 (FK 2 2 8) のジスルフィド結合が開裂したものであって、いわゆる還元型 FK 2 2 8、あるいは FK 2 2 8 チオール体と称することができる (以下、一連の本発明化合物を総称
25 して FK 2 2 8 チオール体ともいう)。

本発明はまた、本発明の FK 2 2 8 チオール体の製造方法を提供する。本発明の FK 2 2 8 チオール体の製造方法は、FK 2 2 8 のジスルフィド結合を開裂す

る工程を含むことを特徴とする。当該結合の開裂は、得られる F K 2 2 8 チオール体のヒストンデアセチラーゼ阻害活性に不利な影響を及ぼさない範囲内で当分野で公知の方法を用いて、また必要に応じて適当に改変することによって行なうことができる。

- 5 より具体的には当該ジスルフィド結合の開裂は、一般的にメルカプトエタノール、チオグリコール酸、2-メルカプトエチルアミン、ベンゼンチオール、パラチオクレゾール、ジチオスレイトール等の通常ジスルフィド結合を有するタンパク質の還元処理に用いられるチオール化合物の使用が例示される。好ましくはメルカプトエタノールならびにジチオスレイトールである。過剰なチオール化合物
- 10 は透析やゲルろ過等により除去することができる。チオール化合物以外に、電気分解、テトラヒドロホウ酸ナトリウム、水素化アルミニウムリチウム、亜硫酸塩等を用いてもよい。

- 上記還元処理は、用いる還元剤の種類に応じて適宜、公知の手法により行なう。例えばメルカプトエタノールやジチオスレイトールを用いる場合には、当該試薬
- 15 を F K 2 2 8 に添加し室温～加温下で、15分～一晚、好ましくは室温で一晩反応させる（生物化学実験法8、SH基の化学修飾、石黒正恒著、学会出版センター、IV、ジスルフィド結合の化学修飾；生物化学実験法10、SH基の定量法、松本博、国則登代著、学会出版センター、III、SS結合の還元、等を参照）。

- 本発明の F K 2 2 8 チオール体の出発原料となる化合物、すなわち F K 2 2 8
- 20 またはその塩は、公知の物質であり、入手可能である。例えば、F K 2 2 8 の立体異性体の一つである F R 9 0 1 2 2 8 物質は、それを生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株を好気性条件下に培養、当該培養ブロスから当該物質を回収することによって得ることができる。F R 9 0 1 2 2 8 物質を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株としては、例えばクロモバクテリウム・ピオラセウム W B 9 6 8 (F E R M B P - 1 9 6 8) が挙げられる。F R 9 0 1 2 2 8
- 25 物質はより具体的には特公平7-64872号公報に記載のとおりにして当該生産菌から得ることができる。F R 9 0 1 2 2 8 物質は、より容易に入手できると

いう点で、FR 901228物質を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株からの回収が好ましいが、さらなる精製工程が不要あるいは少なくすむという点で、合成あるいは半合成のFR 901228物質もまた有利である。また、FK 228は、従来公知の方法により半合成、全合成することができる。より具体的には Khan W.Li,らによって報告されている方法 (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237-7238 (1996)) に準じて製造することができる。

本発明のFK 228チオール体の別の態様は、 R^1 および/または R^2 がチオール保護基である化合物である。当該化合物は、 R^1 および R^2 が水素原子である本発明化合物にチオール保護基を導入することにより調製することができる。

10 本反応で用いられるチオール保護基の適切な導入剤は、導入する保護基に応じて適宜選択されるが、一般的に用いられるもの、例えば対応する保護基の塩化物 (例えばベンジルクロリド、メトキシベンジルクロリド、アセトキシベンジルクロリド、ニトロベンジルクロリド、ピコリルクロリド、ピコリルクロリド-N-オキシド、アントリルメチルクロリド、イソブトキシメチルクロリド、フェニルチオメチルクロリド等) やアルコール類 (ジフェニルメチルアルコール、アダマンチルアルコール、アセトアミドメチルアルコール、ベンズアミドメチルアルコール等)、ジニトロフェニル、イソブチレン、ジメトキシメタン、ジヒドロピラン、クロロギ酸- α -ブチル等が例示される。

20 この反応は、使用する保護基導入剤に応じて適宜従来知られた手法あるいはそれらを適当に組み合わせて実施することができる。さらに当該保護基の脱保護も当業者には公知の技術である (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Second Edition, T.W. Greene, P.G.M. Wuts WILEY-INTERSCIENCE)。具体的に一例を挙げると、導入剤がベンジルクロリドの場合、2 N水酸化ナトリウムおよびエタノールの存在下、30分間、25℃で反応させることにより当該チオール基を保護し、ナトリウムおよびアンモニアの存在下で10分間処理することにより脱保護することができる。

本発明のFK 228チオール体は、ヒトをはじめサル、マウス、ラット、ウサ

ギ、ブタ、イヌ、ウマ、ウシ等種々の哺乳動物において強力なヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有し、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤として有用である。

さらに、本発明のFK228チオール体を含有する医薬組成物は、そのヒストンデアセチラーゼ阻害活性により、異常な遺伝子発現により引き起こされる疾患

- 5 (例えば、炎症性障害、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、原生動物感染など) のための治療薬および予防薬として有用である。さらに、本発明の医薬組成物は、抗腫瘍剤および免疫抑制剤 (これは、以下に例示する臓器移植拒絶および自己免疫疾患を防止する) として有用である。より具体的には以下の疾患が対象となる。

- 10 臓器または組織 (例えば、心臓、腎臓、肝臓、骨髄、皮膚、角膜、肺、脾臓、小腸、肢、筋肉、神経、椎骨間円板、気管、筋芽細胞、軟骨など) の移植による拒絶反応 ;

骨髄移植後の移植片対宿主反応 ;

- 自己免疫疾患 (例えば、リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、橋本甲状腺腫、多発性硬化症、重症筋無力症、I型糖尿病など) ;

病原性微生物 (例えば、アスペルギルス・フミガーツス、フザリウム・オキシスポルム、トリコフィトン・アステロイデスなど) により引き起こされる感染 ;

炎症性または過剰増殖性皮膚障害または免疫仲介型疾患の皮膚兆候 (例えば、乾癬、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、湿疹様皮膚炎、脂漏性皮膚炎、扁平苔癬、

- 20 天疱瘡、水疱性天疱瘡、表皮水疱瘡、蕁麻疹、血管性浮腫、脈管炎、紅斑、皮膚好酸球増加症、エリテマトーデス、にきび、および円形脱毛症) ;

眼の自己免疫疾患 (例えば、角結膜炎、春季カタル、ベーチェット病に付随するブドウ膜炎、角膜炎、ヘルペス性角膜炎、円錐角膜炎、角膜表皮ジストロフィー、角膜白斑、眼天疱瘡、モーレン潰瘍、強膜炎、グレイヴス眼障害、フォークトー

- 25 小柳ー原田症候群、角結膜乾燥 (ドライアイ)、小フリクテン、虹彩毛様体炎、サルコイドーシス、内分泌眼障害など) ;

可逆的閉塞性気道疾患 [喘息 (例えば、気管支喘息、アレルギー性喘息、内因性

- 喘息、外因性喘息、および塵埃喘息）、特に慢性または難治性喘息（例えば、後期喘息および気道過敏症）、気管支炎など]；
- 粘膜または血管の炎症（例えば、胃潰瘍、虚血性または血栓性の血管障害、虚血性腸疾患、腸炎、壊死性腸炎、熱による火傷に関連する消化管の損傷、ロイコトリエン B₄ 仲介型疾患）；
- 5 消化管の炎症／アレルギー（例えば、腹腔の疾患、直腸炎、好酸性胃腸炎、肥脾細胞症、クローン病、および潰瘍性大腸炎）；
- 胃腸管から離れた症候性発現を伴う食物関連アレルギー性疾患（例えば、偏頭痛、鼻炎、および湿疹）；
- 10 腎臓疾患（例えば、間隙性腎炎、グッドパスチャー症候群、溶血性尿毒症症候群、および糖尿病性腎障害）；
- 神経疾患（例えば、多発性筋炎、ギラン＝バレー症候群、メニエール病、多発性神経炎、単発性神経炎、脳梗塞、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化（ALS）、および神経根障害）；
- 15 脳虚血性疾患（例えば、頭部損傷、脳内における出血（例えば、くも膜下出血、脳内出血）、脳血栓、脳塞栓症、心停止、卒中、一過性脳虚血発作（TIA）、および高血圧性脳障害）；
- 内分泌疾患（例えば、甲状腺機能亢進症、およびバセドウ病）；
- 血液疾患（例えば、赤芽球ろう、再生不能性貧血、再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、自己免疫溶血性貧血、顆粒球減少症、悪性貧血、巨大赤芽球貧血、および赤血球形成不全）；
- 20 骨疾患（例えば、骨粗鬆症）；呼吸器疾患（例えば、サルコイドーシス、肺線維症、および特発性間隙性肺炎）；
- 皮膚疾患（例えば、皮膚筋炎、尋常性白斑、尋常性魚鱗癬、光線過敏症、および皮膚 T 細胞リンパ腫）；
- 25 循環器疾患（例えば、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、大動脈炎症候群、結節性多発性動脈炎、および心筋症）；

- 膠原疾患（例えば、強皮症、ヴェーゲナー肉芽腫、およびシェーグレン症候群）；
- 脂肪症；
- 好酸性筋膜炎；
- 5 歯周組織疾患（例えば、歯肉、歯周組織、歯槽骨、またはセメント質への損傷）；
- 腎炎性症候群（例えば、糸球体腎炎）；
- 男性型脱毛症、老人性脱毛症；
- 筋ジストロフィー；
- 10 膿皮症およびセザリー症候群；
- 染色体異常関連疾患（例えば、ダウン症候群）；
- アジソン病；
- 活性酸素媒介疾患[例えば、臓器損傷（例えば、保存、移植、または塞栓症、心筋梗塞などの虚血疾患に関連する、臓器（例えば、心臓、肝臓、腎臓、消化管など）の虚血性循環障害；
- 15 腸管の疾患（例えば、エンドトキシンショック、偽膜性大腸炎、および薬物または放射線により誘発される大腸炎）；
- 腎臓疾患（例えば、虚血性急性腎機能不全、慢性腎不全）；
- 肺疾患（例えば、肺の酸素または薬物（例えば、パラコート、ブレオマイシンなど）により引き起こされる中毒、肺ガン、および肺気腫）；
- 20 眼の疾患（例えば、白内障、鉄貯蔵疾患（眼球鉄症）、網膜炎、色素沈着、老人斑、硝子体瘢痕、角膜のアルカリ火傷）；
- 皮膚炎（例えば、多形性紅斑、免疫グロブリンA水疱性線状皮膚炎、セメント皮膚炎）]；
- 25 ならびに他の疾患（例えば、歯肉炎、歯周炎、敗血症、脾臓炎、および環境汚染（例えば、大気汚染）、加齢、発ガン物質、癌腫の転移、および高山病により引き起こされる疾患）；

- ヒスタミン遊離またはロイコトリエン C 4 遊離により引き起こされる疾患；
- 脈管形成後の冠状動脈再狭窄および外科手術後の癒着の防止；
- 自己免疫疾患および炎症性症状（例えば、原発性粘膜浮腫、自己免疫萎縮性胃炎、早発の閉経、男性不妊、若年性糖尿病、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、交感神経性眼
- 5 炎、水晶体原性ブドウ膜炎、特発性白血球減少症、活性慢性肝炎、特発性肝硬変、円板状エリテマトーデス、自己免疫精巣炎、関節炎（例えば、変形性関節症、または多発性軟骨炎）；
- ヒト免疫不全ウイルス（H I V）感染、A I D S ；
- アレルギー性結膜炎；
- 10 外傷、火傷、または外科手術による、肥大性瘢痕およびケロイド。
- さらに、本発明の F K 2 2 8 チオール体は、そのヒストンデアセチラーゼ阻害活性により、導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤としても有用である。
- 本発明において、導入遺伝子の発現増強とは、ヒトをはじめ、マウス、ラット、
- 15 ブタ、イヌ、ウマ、ウシ等各種の動物細胞に、遺伝子工学的手法により導入される外来遺伝子の寄主細胞中での発現を増強することを意味する。当該導入遺伝子の発現増強は、細胞レベル（すなわちインビトロ）で行われるものであっても、動物レベル（すなわちインビボ）で行われるものであってもよい。好ましくはインビボで行われる。
- ここでインビボ、インビトロとは通常、当分野で用いられている用語どおりで
- 20 あり、すなわち、「インビボ」とは、対象とする生体の機能や反応が生体内で発現される状態を意味し、「インビトロ」とは当該機能や反応が試験管内（組織培養系、細胞培養系、無細胞系等）で発現されることを意味する。
- 本発明において、導入遺伝子の再活性化とは、ヒトをはじめ、マウス、ラット、
- 25 外来遺伝子の発現抑制（サイレンシング）の解除を意味し、本発明は当該再活性化を促進することができる。さらに本発明はサイレンシングの解除以外に一定レベルで安定的に発現している導入遺伝子に対しても転写活性を促し、その発現を

増強させることができる。このような効果も本発明の「導入遺伝子の再活性化」に包含される。当該導入遺伝子の再活性化促進は、細胞レベル（すなわちインビトロ）で行われるものであっても、動物レベル（すなわちインビボ）で行われるものであってもよい。好ましくはインビボで行われる。

- 5 当該外来遺伝子の導入は、当分野で公知の手法を用いて行うことができる。例えば、物理的な方法によるDNAの導入（マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等）、化学的な方法によるDNAの導入（リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法等）、生物学的な方法（レトロウイルスやアデノウイルスといったウイルスベクター等）の他、HVJ-リボソーム法等の新しい手法
- 10 も好適に利用することができる。

- 本発明のFK228チオール体またはその塩を医薬として用いる場合には、活性成分としてのFK228チオール体またはその塩を、経口または非経口適用に適した有機または無機の担体または賦形剤との混合物として含有する固体、半固体または液体形態の医薬組成物の形で使用できる。該活性成分は、例えば、散剤、錠剤、ベレット剤、カプセル剤、坐剤、液剤、乳濁液、懸濁液、エアロゾル剤、スプレー剤、その他の使用に適した形態用の、通常の、無毒性で、医薬として許容しうる担体と混ぜ合わせることができる。更に、必要ならば、助剤、安定剤、増粘剤等を使用してもよい。これらの担体、賦形剤は必要に応じて無菌化処理を施したものを使用してもよく、また製剤化した後に無菌化処理を行うこともできる。
- 15 20 25
- FK228チオール体またはその塩は、導入遺伝子の発現増強あるいは再活性化が必要とされる状態に対して所望の効果を生じるのに十分な量を当該発現増強剤や再活性化促進剤に含ませればよい。特に、本発明の発現増強剤や再活性化促進剤を遺伝子治療に使用する場合には、非経口的投与、即ち静脈内投与、筋肉内投与、組織内直接投与、鼻腔内投与、皮内投与、髄液内投与、胆管内投与、膈内投与等が好ましく、また、導入遺伝子の発現や再活性化が要求される部位や器官に直接投与し得るリボソーム法等も好適に使用することができる。

活性成分であるFK228チオール体またはその塩の治療上有効な用量は、処

置すべき個々の患者の年齢および疾患、また、導入遺伝子の発現増強剤あるいは再活性化剤として使用する場合には当該導入遺伝子の種類や、当該遺伝子の発現増強や再活性化促進を必要とする疾患の種類によっても相違し、またそれらに依存して決定される。

- 5 本発明のFK228チオール体またはその塩を有効成分として含有する医薬の投与方法も、所望とする効果が得られれば、特に限定されず、例えば、経口、非経口的に1日1回から数回にわたって投与することができる。特に遺伝子治療に使用する場合には、その使用の特殊性を考慮して、導入遺伝子の発現、再活性化に最も適した投与方法を適宜選択して使用する。例えば、腫瘍に対する遺伝子治療の場合、腫瘍細胞への直接投与（例えばリポソーム法）が好ましい。

- 10 本発明の導入遺伝子の発現増強剤ならびに再活性化促進剤は、導入遺伝子の発現を増強させること、ならびに発現抑制にある導入遺伝子の、その抑制を解除することを特徴とするものであり、当該効果は、導入遺伝子との相互作用が重要な要因となる。したがって、導入遺伝子の投与と、本発明の発現増強剤または再活性化促進剤の対象への投与（インビボ、インビトロ）は、所望の効果に応じて適宜決定される。例えば導入遺伝子の発現増強を目的とする場合には、当該導入遺伝子の投与と同時に、あるいは投与後に本発明の導入遺伝子発現増強剤を投与することが好ましい。一方、既に導入された遺伝子の再活性化の促進を目的とする場合には、導入遺伝子の投与後、再活性化が必要な時に本発明の導入遺伝子再活性化促進剤を投与することが好ましい。導入遺伝子の投与後に本発明の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤を投与する場合、その投与のタイミングは、所望とする効果やその程度、先に導入された遺伝子の発現状況（発現の程度や導入遺伝子の存在場所等）に応じて適宜決定される。

- 25 本発明の導入遺伝子の発現増強剤ならびに再活性化促進剤は特に遺伝子治療に好適に使用することができる。例えば癌に対する遺伝子治療としては、自殺遺伝子の導入やDNAワクチン等が挙げられる。自殺遺伝子の導入としては、抗癌剤5-フルオロシトシン（5-FU）の抗癌活性体への変換酵素であるシトシンデ

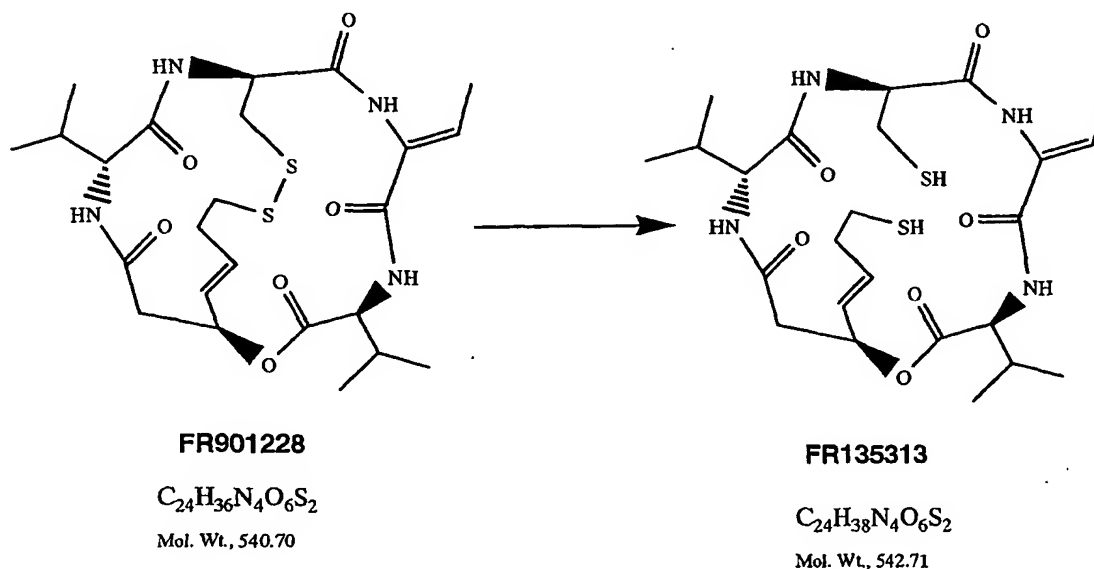
アミナーゼ遺伝子の癌細胞への導入が挙げられ、当該遺伝子の癌細胞内での発現を本発明により増強させることができる（癌細胞特異的に 5-FU を効率的に活性体に変換することにより抗腫瘍効果を誘導する）。DNA ワクチンとしては、癌細胞で特異的に発現している癌抗原遺伝子が挙げられ、当該遺伝子を癌患者に導入することにより、あるいは発現抑制されている内因性癌抗原遺伝子の再活性化により、また、あるいはその両方により、癌抗原遺伝子の機能発現を増強させることによって患者の癌免疫を高めることができる。

癌に対する遺伝子治療においては、他に p53 遺伝子や、サイトカイン遺伝子（例えば IL2、IL12 遺伝子）、アンチセンス遺伝子（K-ras アンチセンス）等を用いることができる。また、嚢胞性線維症の遺伝子治療としては CFTR 遺伝子を、血友病の遺伝子治療としては凝固因子遺伝子を使用することができる。

実施例

以下、本発明を製造例ならびに実験例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

製造例：FR135313 の製造



特公平 7-64872 号公報の記載に準じて単離、精製された FR90122

8を出発物質として用いた。FR 9 0 1 2 2 8 (51.6 mg、95 μ mol)、
水(40 ml)およびアセトニトリル(10 ml)の混合物に、ジチオスレイト
ール(412 mg、2.66 mmol)を添加し、室温で一晩放置した。蒸留に
よりアセトニトリルを除去した後、該混合物を分取HPLCで精製した(洗浄は
5 20%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸水溶液で、溶出は50%ア
セトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸水溶液でそれぞれ行なった)。

目的化合物を含有する画分を回収し、凍結乾燥してFR 1 3 5 3 1 3を粉末と
して得た(14.8 mg、収率28.7%)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMF- d_7) δ : 9.35 (1H, br s, 交換可能), 8.15 (1H, br
10 d, $J=9\text{Hz}$, 交換可能), 8.01 (1H, br d, $J=7\text{Hz}$, 交換可能), 6.83 (1H, d, $J=7$
Hz, 交換可能), 6.81 (1H, q, $J=7\text{Hz}$), 5.72 (1H, m), 5.61-5.54 (2H, m), 4.6
0(1H, dd, $J=10\text{Hz}$, 5Hz), 4.55 (1H, m), 4.15 (1H, dd, $J=9\text{Hz}$, 8Hz), 2.97-2.
88 (2H, m), 2.73-2.63 (2H, m), 2.55 (2H, m), 2.44 (1H, t, $J=8\text{Hz}$, 交換可
能), 2.34-2.27 (3H, m), 2.20 (1H, m), 2.08 (1H, t, $J=8\text{Hz}$, 交換可能), 1.7
15 2 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 0.98 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 0.95 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 0.88 (3H, d,
 $J=7\text{Hz}$), 0.87 (3H, d, $J=7\text{Hz}$)

MS m/e 654 (M+TFA)

目的化合物の純度は、下記条件下でHPLCによって確認した。

HPLC条件

20 カラム: YMC-PACK ProC18 (YMC Co., Ltd)、4.6 \times 150 mm

溶出: 50%アセトニトリル/0.05%トリフルオロ酢酸水溶液

流速: 1 ml/分

検出: 214 nm、254 nm

保持時間: 4.01分(出発物質のFR 9 0 1 2 2 8物質の保持時間は4.27
25 分)

実験例: ヒストンデアセチラーゼ活性の測定

製造例1で合成したFR 1 3 5 3 1 3物質のヒストンデアセチラーゼ阻害活性

を調べた。

1. 実験材料・実験方法

(1) 細胞

マウス乳腺癌 FM3A は、横浜市立大学医学部 鮎沢 大博士より分与された。

- 5 本細胞は、2% の FBS を含む ES 培地 (Flow laboratories 社、以後 ES 培地と呼ぶ) で、37℃、5% CO₂ 存在下で継代培養した。

(2) 薬剤

酪酸ナトリウムは和光純薬社より、[³H] 酢酸ナトリウムは Amersham 社よりそれぞれ購入した。

10 (3) 緩衝溶液等

リシスバッファー (pH 6.5) : 10 mM Tris-HCl (Sigma 社)、50 mM 重亜硫酸ナトリウム (半井化学社)、1% Triton X-100 (半井化学社)、10 mM 塩化マグネシウム (半井化学社)、8.6% シュクロース (半井化学社)

- 15 洗浄バッファー (pH 7.4) : 10 mM Tris-HCl、13 mM EDTA (Sigma 社)

HDA バッファー (pH 7.5) : 15 mM リン酸カリウム (半井化学社)、5% グリセロール、0.2 mM EDTA

(4) [³H] アセチル化ヒストンの調製

- 20 ヒストンデアセチラーゼの基質とする [³H] アセチル化ヒストンは、1 × 10⁸ 個の FM3A 細胞 (50 ml の ES 培地に懸濁) を 0.5 mCi/ml の [³H] 酢酸ナトリウムと 5 mM の酪酸ナトリウムの存在下で、37℃、5% CO₂ 存在下で 30 分間培養し、以下に記した方法で直ちに、処理細胞よりヒストン画分を抽出することにより調製した。放射特異活性は 0.45 μCi/mg ヒ
- 25 ストンであった。

(5) 細胞よりのヒストンタンパク質の抽出

培養細胞からのヒストンタンパク質の抽出は、吉田らの方法に従って行なった

(M. Yoshida ら、J. Biol. Chem. 265, 17174-17179 (1990))。 1×10^8 個の $[^3\text{H}]$ 酢酸ナトリウムで標識した FM3A 細胞を回収し、PBS で 1 回洗浄した。洗浄した細胞を 1 ml の氷冷したリシスバッファーに懸濁し、ダウンスホモジナイザーで破碎した。1000 回転で 10 分間遠心して核を集めた後、リシスバッファーで 3 回、続いて洗浄バッファーで 1 回洗浄した。残渣を 0.1 ml の氷冷した蒸留水に懸濁し、これに最終濃度 0.4 規定になるように濃硫酸（和光純薬社）を加え、4℃で 1 時間放置した。微量遠心機で 15,000 回転、5 分間遠心し、上清を採取し、これに 1 ml のアセトンを加え、一晚 -20℃に放置した。沈殿物を微量遠心機で 15,000 回転、10 分間遠心して回収し乾燥させた。

(6) 細胞からの粗ヒストンデアセチラーゼの抽出

マウスヒストンデアセチラーゼは、FM3A 細胞より粗精製した。8 L 容のスピナー培養瓶で懸濁培養した FM3A 細胞（ES 培地 4 L に 1×10^6 個/ml の濃度）を、遠心にて回収し、40 ml の HDA バッファーに懸濁した。細胞をダウンスホモジナイザーで破碎した後、細胞核を 35,000×g で 10 分間遠心することにより回収し、1 M 硫酸溶液 20 ml 中にてさらに破碎した。白濁した破碎液を、超音波処理し、遠心することにより透明な抽出液とし、それに硫酸を添加し、硫酸濃度を 3.5 M まで上昇させることにより、ヒストンデアセチラーゼを沈殿させた。沈殿を 10 ml の HDA バッファーに溶解し、同バッファー 4 L に対して透析した。透析物は、HDA バッファーで緩衝化した。DEAE セルロース（DE 52、25×85 mm、Whatman 社）に付し、300 ml の NaCl のリニアグラジェント（0-0.6 M）で溶出した。ヒストンデアセチラーゼ活性は、0.2-0.3 M の NaCl 溶出区にシングルピークの活性として溶出された。本精製により、ヒストンデアセチラーゼは約 60 倍の比活性に精製された。

(7) インビトロ ヒストンアセチル化反応

4 μl の $[^3\text{H}]$ アセチル化ヒストン（2500 cpm/5 μg ）と 96 μl

の粗ヒストンデアセチラーゼ画分を混和し、これに種々の最終濃度になるように、上記製造例に従って調製したFR 135313物質のエタノール溶液1 μ lを加え、37℃で10分間反応させた。反応は10 μ lの濃塩酸を加えることにより停止させ、放出された [3 H] 酢酸を1 mlの酢酸エチルで抽出し、その0.9 mlを5 mlのトルエンシンチレーション溶液に添加し放射活性を測定した。

(8) 結果

還元体（チオール体）であるFR 135313物質は、 IC_{50} 値で1 ng/ml以下のヒストンデアセチラーゼの阻害活性を示した。

チオール基は強力なキレート作用を有し、従って還元環境下でチオール体となったFR 901228物質は、メタロ酵素であるヒストンデアセチラーゼに指向することによって、当該酵素の活性を阻害していると考えられる。

産業上の利用可能性

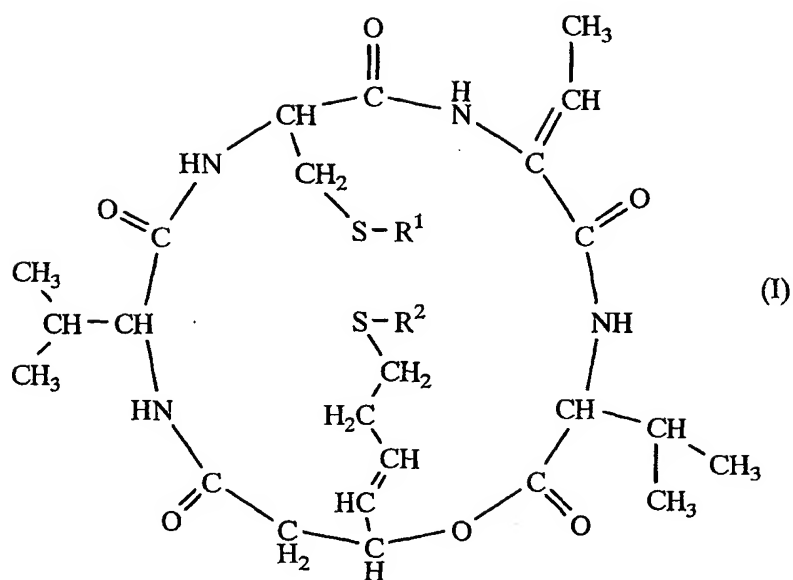
FK 228の還元体（チオール体）である式(I)化合物、特にFR 901228物質の還元体（チオール体）であるFR 135313物質、またはそれらの塩は強力なヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有し、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、および炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病(APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の予防・治療剤、さらには導入遺伝子の発現増強剤・再活性化促進剤として有用である。

チオール基の活性を調節することにより、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を調節することができ、従って種々の臨床的応用に適した医薬の開発が可能となる。

本発明は、日本で出願された特願2000-216584を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

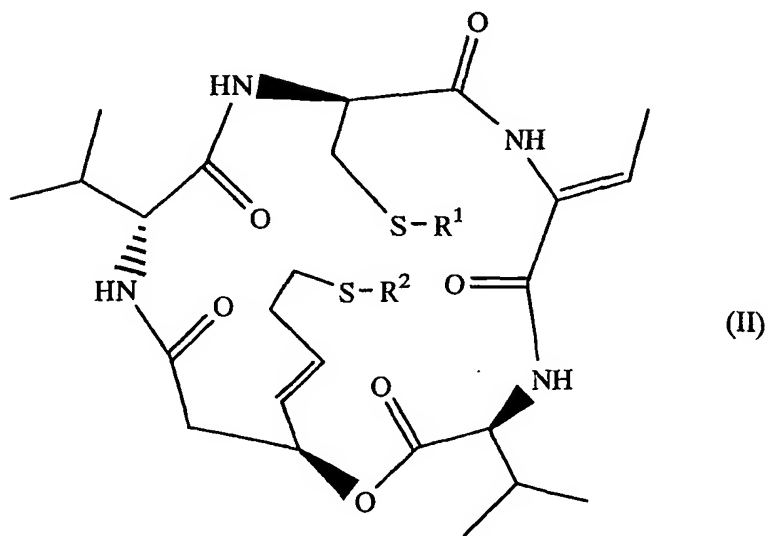
1. 式 (I)



- 5 (式中 R^1 および R^2 はそれぞれ同一または異なって水素原子またはチオール保護基である)で表される化合物またはその塩。

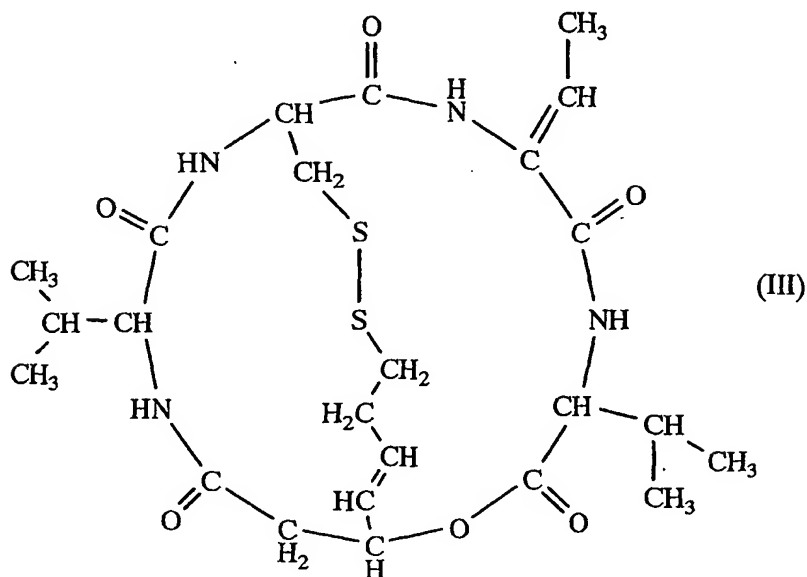
2. R^1 および R^2 がそれぞれ水素原子である請求の範囲1に記載の化合物またはその塩。

3. 式 (II)



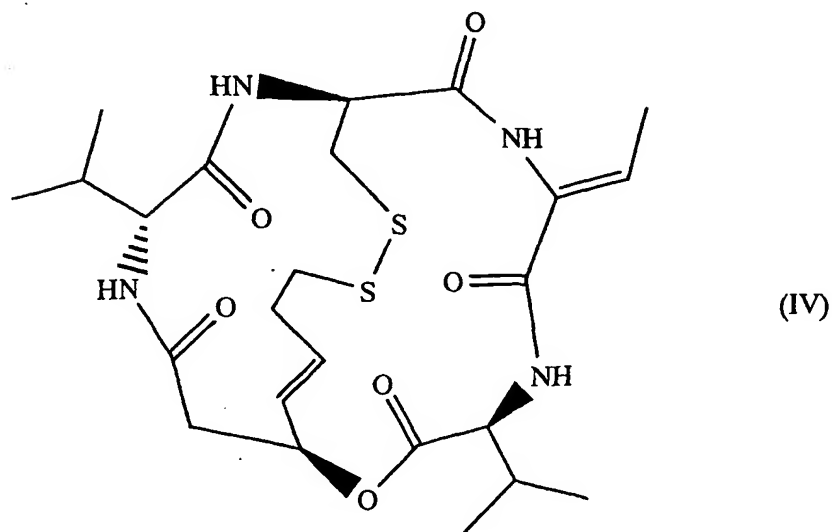
(式中 R^1 および R^2 はそれぞれ水素原子である)で表される化合物である、請求の範囲2に記載の化合物またはその塩。

4. 式 (III)



- 5 で表される化合物におけるジスルフィド結合を開裂する工程を含む、請求の範囲1～3のいずれかに記載の化合物またはその塩の製造方法。

5. 式 (III) 化合物が、式 (IV)



で表される化合物である、請求の範囲4に記載の製造方法。

- 10 6. 式 (IV) 化合物を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株を水性栄養

培地中で好気性条件下に培養し、当該化合物を回収する工程および該回収した式
(IV) 化合物におけるジスルフィド結合を開裂する工程を含む、請求の範囲 5 記載の製造方法。

7. 請求の範囲 1～3 のいずれかに記載の化合物またはその塩からなるヒストン
5 デアセチラーゼ阻害剤。

8. 有効成分として、請求の範囲 1～3 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の治療または予防用の医薬組成物。

10 9. 有効成分として、請求の範囲 1～3 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

10. 医薬である請求の範囲 9 に記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

11. 医薬が遺伝子治療用である請求の範囲 10 に記載の導入遺伝子の発現増強
15 剤または再活性化促進剤。

12. 医薬的に有効量の、請求の範囲 1～3 のいずれかに記載の化合物またはその塩を患者に投与することを含む、腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の治療方法または予防方法。

20 13. 医薬的に有効量の、請求の範囲 1～3 のいずれかに記載の化合物またはその塩を患者に投与することを含む、導入遺伝子の発現増強方法または再活性化促進方法。

14. 患者への投与が遺伝子治療において実施されるものである、請求の範囲 13 に記載の方法。

25 15. 腫瘍、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病合併症、ホモ接合サラセミア、線維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病 (APL)、臓器移植拒絶または自己免疫疾患の治療または予防用の医薬組成物の製造のための、請求の範囲 1～3 のいずれかに記載

の化合物またはその塩の使用。

16．導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤の製造のための、請求の範囲1～3のいずれかに記載の化合物またはその塩の使用。

17．導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤が遺伝子治療に使用される
5 ものである、請求の範囲16に記載の使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K5/103, C12N9/99, A61K38/12, A61P29/00, A61P35/00, A61P3/10,
A61P7/06, A61P1/16, A61P35/02, A61P37/06, A61P43/00, A61P48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K5/10-5/12, C12N9/99, A61K38/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 352646 A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD), 31 January, 1990 (31.01.90), & US 4977138 A & DE 68909139 E & NO 8903021 A & JP 2-85296 A	1-12, 15, 16
A	WO 95/7293 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 16 March, 1995 (16.03.95), & EP 672679 A1 & US 5847074 A & DE 69408299 E & JP 7-508586 A	1-12, 15, 16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2001 (29.08.01)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2001 (02.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05954

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:


1. ☒ Claims Nos.: 13,14,17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13, 14 and 17 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C07K5/103, C12N9/99, A61K38/12, A61P29/00, A61P35/00, A61P3/10, A61P7/06, A61P1/16, A61P35/02, A61P37/06, A61P43/00, A61P48/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ¹ C07K5/10~5/12, C12N9/99, A61K38/12		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG) CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 352646 A1 (FUJISAWA PHARM CO LTD) 31. 1 月. 1990 (31. 01. 90) & US 4977138 A & DE 68909139 E&NO 8903021 A&JP 2-85296 A	1-12, 1 5, 16
A	WO 95/7293 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 16. 3月. 1995 (16. 03. 95) & EP 672679 A1 & US 5847074 A&DE 69408299 E&JP 7-508586 A	1-12, 1 5, 16
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29. 08. 01	国際調査報告の発送日 02.10.01	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 	

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13, 14, 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲13, 14, 17は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTC)